

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 06-087904

(43)Date of publication of application : 29.03.1994

(51)Int.Cl.

C08B 37/00
C07B 63/00
// C07B 61/00

(21)Application number : 03-177508

(71)Applicant : OXFORD GRYCOSYST LTD

(22)Date of filing : 21.06.1991

(72)Inventor : PAREKH RAJESH B
MERRY ANTHONY H
BRUCE JAMES

(30)Priority

Priority number : 90 9013828 Priority date : 21.06.1990 Priority country : GB

(54) PROCESS FOR RELEASING AND ISOLATION OF N-GLYCAN AND O-GLYCAN

(57)Abstract:

PURPOSE: To release N- and O-glycan from glycoconjugates.

CONSTITUTION: The process for release of N- and O-glycan, and by adsorbing the released N- and O-glycans on chromatographic substance and eluting selectively, the process for isolating the glycan are provided. These processes are characterized by the following: glycoconjugates is placed under the influence of hydrazine agent (wherein the glycoconjugates are essentially salt-free and anhydrous, and the hydrazine is essentially anhydrous); the condition, where the glycoconjugates is placed under influence of hydrazine agent, N- and O-glycans are adsorbed by the chromatographic substance and are selectively eluted to release N- and O-glycan by a process which can recover the glycan in the essentially non-reducing and perfect form, is controlled.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the
examiner's decision of rejection or application
converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of
rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision
of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

BEST AVAILABLE COPY

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平6-87904

(43) 公開日 平成6年(1994)3月29日

(51) Int.Cl. ⁵	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 0 8 B 37/00	Z	7329-4C		
C 0 7 B 63/00	F	7419-4H		
// C 0 7 B 61/00	B	7419-4H		

審査請求 未請求 請求項の数21(全 18 頁)

(21) 出願番号	特願平3-177508	(71) 出願人	591156054 オックスフォード、グリコシステムズ、リミテッド OXFORD GLYCOSYSTEMS LIMITED イギリス国オクソン、アビンドン、ブラックランズ、ウェイ、ヒッチング、コート、ユニット、4
(22) 出願日	平成3年(1991)6月21日	(72) 発明者	ライエシ、ピークフ、パレフ イギリス国オクソン、カートリントン、パウンド、クロース、2
(31) 優先権主張番号	9 0 1 3 8 2 8 . 0	(74) 代理人	弁理士 佐藤 一雄 (外2名)
(32) 優先日	1990年6月21日		
(33) 優先権主張国	イギリス (GB)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 N - グリカン及びO - グリカンの放出及び単離

(57) 【要約】 (修正有)

【目的】 糖複合体からN - 及びO - グリカンを放出させる方法を提供する。

【構成】 糖複合体をヒドラジン試薬の影響下におき（ここで、前記糖複合体は実質上無塩かつ実質上無水であり、前記ヒドラジン試薬は実質上無水である）、実質上非還元かつ完全な形でN - 及びO - グリカンを後に回収しうるような方法で糖複合体からN - 及びO - グリカンを放出させるように、糖複合体がヒドラジン試薬の影響下におかれている条件をコントロールすることを特徴とするN - 及びO - グリカンを放出させる方法、ならびに放出されたN - 及びO - グリカンをクロマトグラフィー物質に吸着させ、ついで選択的に溶出することによって、それぞれを単離する方法。

1

【特許請求の範囲】

【請求項1】糖複合体からN-及びO-グリカンを放出させる方法であって、

糖複合体をヒドラジン試薬の影響下におき（ここで、前記糖複合体は実質上無塩かつ実質上無水であり、前記ヒドラジン試薬は実質上無水である）、実質上非還元かつ完全な形でN-及びO-グリカンを後に回収しようとする方法で糖複合体からN-及びO-グリカンを放出させるように、糖複合体がヒドラジン試薬の影響下におかれている条件をコントロールすることを特徴とする方法。

【請求項2】N-及びO-グリカンが収率85%以上で得られる、請求項1に記載の方法。

【請求項3】糖複合体から非還元かつ完全N-及びO-グリカンを放出させるために、完全な形でN-及びO-グリカンを後に回収しようとする方法で複合体からN-及びO-グリカンを放出させるような最適条件下で、実質上無塩かつ本質的に無水の複合体を主に無水のヒドラジン試薬と共に加熱することからなる、請求項1又は2に記載の方法。

【請求項4】放出された完全かつ非還元N-及びO-グリカン単離する工程を含む、請求項1～3のいずれか一項に記載の方法。

【請求項5】N-及びO-グリカンの放出のために、糖複合体をヒドラジン試薬の影響下におき（ここで、前記糖複合体は実質上無塩かつ実質上無水であり、前記ヒドラジン試薬は実質上無水である）、実質上非還元かつ完全な形でN-及びO-グリカンを後に回収しようとする方法。

2

*方法で糖複合体からN-及びO-グリカンを放出させるように糖複合体がヒドラジン試薬の影響下におかれている条件をコントロールし、クロマトグラフィー物質にN-及びO-グリカン（及びそのいずれかの誘導体）を吸着させるために、糖複合体をヒドラジン試薬の影響下におくことで形成された反応混合物を第一クロマトグラフィー物質と接触させ、クロマトグラフィー物質を溶出に付し（上記吸着及び上記溶出は複合体及び／又は複合体由来物質からN-及びO-グリカン（及びそのいずれかの誘導体）を分離させかつヒドラジン試薬を除去させるように行われる）、遊離第一アミノ酸基を有するN-及びO-グリカンの誘導体が存在する場合にはその誘導体から非還元グリカンを得るためN-アセチル化反応を行い、N-アセチル化反応が行われた方法で必要とされる場合にはN-アセチル化反応後に得られた反応混合物から一価及び／又は二価陽イオンを除去し、第二クロマトグラフィー物質への吸着及びそれからの選択的溶出によりかかる反応混合物からN-及びO-グリカン又はその誘導体を分離し、いずれのN-及びO-グリカン誘導体も非還元形に変換する工程を含んでなる、N-及びO-グリカンの単離も含む、請求項1～4のいずれか一項に記載の方法。

【請求項6】条件が完全N-及びO-グリカンの前選択収率を達成しようとして下記方程式に従い選択される、請求項1～5のいずれか一項に記載の方法。

【数1】

$$m_o = \left[e^{-(A_{do} e^{-E_o^D/RT}) \cdot t} \right] - \left[e^{-(A_{ro} e^{-E_o^R/RT}) \cdot t} \right]$$

及び

※ ※【数2】

$$m_N = - \left[e^{-(A_{xN} e^{-E_N^A/RT}) \cdot t} \right] + \left[e^{-(A_{DN} e^{-E_N^D/RT}) \cdot t} \right]$$

〔上記式中 m_o = 完全形で放出されるO-グリカンのモル分率

m_N = 完全形で放出されるN-グリカンのモル分率

e = 自然対数

A_{ro} = O-グリカンの放出に関するアレニウス定数

A_{do} = O-グリカンの分解に関するアレニウス定数

E_o^A = O-グリカンの放出に関する活性化エネルギー

E_o^D = O-グリカンの分解に関する活性化エネルギー

A_{rN} = N-グリカンの放出に関するアレニウス定数

A_{DN} = N-グリカンの分解に関するアレニウス定数

E_N^A = N-グリカンの放出に関する活性化エネルギー

E_N^D = N-グリカンの分解に関する活性化エネルギー

R = 気体定数

T = 温度

t = 時間

【請求項7】条件が完全N-及びO-グリカンの収率8

5%以上を達するように選択される、請求項6に記載の方法。

【請求項8】糖複合体が糖タンパク質、糖ホルモン又は糖脂質である、請求項1～7のいずれか一項に記載の方法。

40 【請求項9】糖複合体をヒドラジン試薬の影響下におく前に糖複合体から塩を除去する工程を更に含む、請求項1～8のいずれか一項に記載の方法。

【請求項10】糖複合体をヒドラジン試薬の影響下におく前に糖複合体から水を除去する工程を更に含む、請求項1～9のいずれか一項に記載の方法。

【請求項11】ヒドラジン試薬がヒドラジン、ヒドラジン蒸気、ヒドラジンの化合物又はヒドラジンの誘導体である、請求項1～10のいずれか一項に記載の方法。

【請求項12】糖複合体及びヒドラジン試薬と一緒にされ、得られた反応混合物が加熱される、請求項1～11

のいずれか一項に記載の方法。

【請求項13】N-アセチル化反応が第一クロマトグラフィー物質からの脱着前に行われる、請求項5に記載の方法。

【請求項14】N-アセチル化反応が第一クロマトグラフィー物質からの脱着後に行われる、請求項5に記載の方法。

【請求項15】アセトヒドラゾン誘導体である得られたN-及びO-グリカンの誘導体が、非還元N-及びO-グリカンを形成させるために酸性条件下におかれる、請求項1～14のいずれか一項に記載の方法。

【請求項16】塩が透析、ゲル濾過又はクロマトグラフィーにより糖複合体から除去される、請求項9に記載の方法。

【請求項17】水が凍結乾燥により糖複合体から除去される、請求項10に記載の方法。

【請求項18】水が25℃で25ミリバールの凍結乾燥条件下で少なくとも平衡な含水率まで除去される、請求項17に記載の方法。

【請求項19】ヒドラジン試薬が4容量/容量%を超えない含水率を有する、請求項1～18のいずれか一項に記載の方法。

【請求項20】糖複合体が牛血清フェツインである、請求項1～19のいずれか一項に記載の方法。

【請求項21】完全N-及びO-グリカンが95℃で3.75時間のヒドラジンとのインキュベーションにより糖複合体から放出される、請求項1～20のいずれか一項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】発明の背景

本発明は、糖複合体からのN-グリカン及びO-グリカン（即ち、“N-及びO-結合型”オリゴ糖）の放出方法、並びに、かかるグリカンの単離に関する。糖複合体の例は糖タンパク質、糖ホルモン又は糖脂質である。

【0002】“N-結合型”オリゴ糖はN-グリコシド結合で複合体に共有結合されたオリゴ糖であり、“O-結合型”オリゴ糖はO-グリコシド結合で複合体に結合されたオリゴ糖である。糖タンパク質で典型的にみられるような結合の例は添付図面の図1で示されている。本明細書において、放出とは“N-及びO-結合型”オリゴ糖を複合体に結合させる共有N-及びO-グリコシド結合の開裂を導く方法又はプロセスに関し、単離とは複合体又は複合体由来物質から放出されるオリゴ糖の物理的分離を導く方法又はプロセスに関する。

【0003】糖複合体からの“N-及びO-結合型”オリゴ糖（以下、各々N-及びO-グリカンと称される）の放出及びその後の単離はいくつかの理由から重要である。これらのうち主なものは以下である：第一に、糖複合体の詳細な構造的特徴化にはあらゆる連結グリカンの構造分析が必要となる。いくつかのこのようなグリ

カンは単一複合体に結合されており、しかもグリカンの構造分析は単一の精製グリカンで最も正確に行われることから、このような分析はまえもっての複合体からかかるグリカンの放出、それに続く複合体からのかかるグリカンの単離、そして他からのグリカンの精製を必要とする。第二に、このようなグリカンはそれ自体重要な生物学的分子として次第に認識されてきている。N-及びO-グリカンの生物学的性質の研究は複合体でないN-及びO-グリカンを用いて優先的に行われる。

【0004】糖複合体からN-及びO-グリカンの放出及び単離をうまく行う方法で同時に満足されるべき基準は以下のとおりである：

(i) 放出方法は、好ましくはオリゴ糖成分及び複合体成分双方の性質から独立した方法でN-及びO-グリコシド結合を開裂するべきである。

(ii) 放出方法は、好ましくは開裂されたグリカンにとり永続的な（即ち、容易に可逆的でない）化学的ダメージなしに開裂を行うべきである。

(iii) 単離方法は、前記(i)のように好ましくはオリゴ糖成分及び複合体成分双方の性質から独立した方法で複合体からN-及びO-グリカンを分離するべきである。

(iv) 単離方法は、好ましくは開裂されたグリカンに化学的ダメージを与えることなく単離を達成すべきである。

【0005】加えて、その方法は出発糖複合体の量に関係なく高収率（例えば85%以上）で放出されたN-及びO-グリカンの回収も果たせることが好ましい。

【0006】以前は、2つの異なる方法がN-及びO-グリカン双方の放出のために用いられてきた。これらを以下で簡単に要約し、上記基準に従い評価する。

【0007】A. 酵素方法 - 例えば、糖タンパク質から糖ペプチドを得るためプロナーゼのようなタンパク質分解酵素を使用し、及び/又は、糖複合体から一部のO-グリカンを開裂するためO-グリカナーゼ(O-glycanaseTM) (E.C.No.3.2.1.97) 及び複合体から一部のN-グリカンを開裂するためN-グリカナーゼ(N-glycanaseTM) (E.C.No.3.2.2.18) のような酵素の混合物を使用する。このような方法はいくつかの理由から、但し主にグリカン放出の選択性のために、通常満足できない。酵素は本来非常に特異的であり、あるグリカンのみを放出し、しかも結合複合体によりいくぶん影響される。即ち、現在実施かつ理解されるような酵素方法は上記基準(i)を満足しない。

【0008】B. 化学的方法 - 2つの化学的方法がN-及びO-グリカンの放出のために実施されてきた。これらは以下である：

【0009】(i) アルカリ溶液を使用する。N-及びO-グリカンを複合体に結合させるN-及びO-グリコシド結合はアルカリで不安定であり、したがってアルカリ溶液はN-及びO-グリカンの放出に用いることができ

る。例えば、1M NaOHと共に100℃で4時間のインキュベーションが成功裡に用いられてきた。この方法の確立かつ認容された不利な点は、ほとんどのN-及びO-グリカンがアルカリ不安定性であることである。ペプチドに結合されるほとんどのN-及びO-グリカンは添付図面の図2で示された構造で結合されている。アルカリによる開裂(図2)時に、還元末端単糖残基(N-グリカンにおいてN-アセチルグルコサミン又はGlcNAc、及び、O-グリカンにおいてN-アセチルガラクトサミン又はGalNAc)は更にアルカリで分解される。このような分解は大過剰の還元剤存在下でアルカリ誘導放出を行うことによる還元末端残基の還元で防止できる。典型的には4M NaBH₄が用いられる。この還元では放出されるグリカンをアルジツール形に変換する(図2)。したがって、過剰還元剤の存在又は非存在に関係なく、放出されたグリカンは永続的に化学的変換された形(即ち、天然化合物としてでない)で回収される。このためこの方法は前記基準(ii)を満足しない。

【0010】(ii) 無水ヒドラジンを使用する。O-グリカンに関する科学文献中いくつかの報告は、O-グリカンが無水糖タンパク質を無水ヒドラジンと共に高温(典型的には100℃以上)で数時間(典型的には10時間以上)インキュベートした後にペプチド複合体から放出されることを示唆している。このような各報告は、こうして放出されるいかなるO-グリカンもヒドラジンにより放出O-グリカンの過度の化学的分解及び変換をうけることを更に示している。実際に、一般的な科学的見解では、“O-グリコシド結合グリカンのヒドラジンに対する挙動はまだ説明されていない。しかしながら、一部の結果はアルカリ安定結合が“ピーリング”(peeling)反応を停止させるまでそれらがかなり分解されることを示している”(J. Montreuil et al., in 'Carbohydrate Analysis-A Practical Approach' (炭水化物分析-実施アプローチ), Ed. M. F. Chaplin及びJ. F. Kennedy, IRL Press, 1986)。N-グリカンに関しては、多数の著者らが糖タンパク質からN-グリカンのヒドラジン分解による放出について研究してきた。現在好ましい方法はRademacher及びDwek(欧州特許出願第0, 215, 766A2号明細書)の方法である。N-グリカンのみを扱うこの方法は、不確定な収率でしかし構造に関して完全なN-グリカンを回収する1組の条件が規定された方法である。したがって、Rademacher及びDwekの方法はすべての前方法の改良法であったが、但しこの明細書で開示された結果から示されるように比較的低収率でN-グリカンを生じ、O-グリカン含有糖タンパク質に適用された場合には分解された(即ち、化学的に変換された)O-グリカンを回収することになるであろう。これらの結果は、Rademacher及びDwekの研究がO-グリカンを考慮しなかった(即ち、糖タンパク質をN-グリカンのみで考えた)という事実から派生している。このため現在実施

されているこの方法は、糖タンパク質サンプルから完全N-及びO-グリカンの回収には通常適用できない。要するに、現在実施かつ理解されているような前記方法はいずれも完全未変換N-及びO-グリカンの放出に適さないのである。

【0011】発明の概要

本発明の一面によれば、糖複合体をヒドラジン試薬の影響下におき(ここで、前記糖複合体は実質上無塩かつ実質上無水であり、前記ヒドラジン試薬は実質上無水である)、実質上非還元かつ完全な形でN-及びO-グリカンを後に回収しうるような方法で糖複合体からN-及びO-グリカンを放出させるように糖複合体がヒドラジン試薬の影響下におかれている条件をコントロールすることからなる、糖複合体からN-及びO-グリカンを放出させる方法が提供される。

【0012】一態様において、本発明はN-及びO-グリカンの高収率を達成するために用いられる。本発明によれば、高収率とは85%以上と定義されるが、但し収率が実際上有益であるかぎりこれより低くてもよい。

【0013】糖複合体は場合によりヒドラジン試薬の影響下におきかつエネルギー入力に付してもよい。このため例えば、糖複合体及びヒドラジン試薬は一緒にされ、得られた反応混合物はいずれか適切な手段で加熱される。他の形のエネルギー入力も所望であれば用いてよい(例えば、マイクロ波照射又は赤外線照射)。

【0014】ヒドラジン試薬は、N-及びO-グリカンを複合体に結合させるN-グリコシド及びO-グリコシド結合の望ましい開裂を起こしうるのであれば、ヒドラジン自体でも又はそのいずれかの適切な誘導体もしくは化合物(例えば、関連塩)であってもよい。ヒドラジン試薬は例えば液体形又は蒸気形で用いられる。

【0015】一例として、本発明は完全な形でN-及びO-グリカンを後に回収しうるような方法で複合体からこのようなグリカンを放出させるような最適条件下で、実質上無塩かつ本質的に無水の糖複合体を主に無水のヒドラジン試薬と共に加熱することからなる糖複合体から非還元かつ完全N-及びO-グリカンを放出させるための方法を提供する。

【0016】本明細書で用いられる“無塩”という用語は、本発明による方法の実施(例えば、糖複合体からN-及びO-グリカンの放出)で何らかの許容しえない干渉をおこせる程度までには塩を含有していないことを意味する。

【0017】本明細書で用いられる“無水”という用語は、本発明による方法の実施(例えば、糖複合体からN-及びO-グリカンの放出)で何らかの許容しえない干渉をおこせる程度までには水を含有していないことを意味する。加熱は微視的又は巨視的にいずれで行ってもよい。

【0018】一態様において、本発明の方法はヒドラジ

ン試薬の影響下におく前に糖複合体から塩を除去する工程を含んでもよい。

【0019】もう1つの態様において、本発明の方法はヒドラジン試薬の影響下におく前に糖複合体から水を除去する工程を含んでもよい。

【0020】本発明は完全かつ非還元N-及びO-グリカン単離する工程を含んだ糖複合体からのN-及びO-グリカンの放出方法も提供する。放出後、いかなる残留未反応ヒドラジン試薬も、放出された全部のN-及びO-グリカンを未分別プールとして残しておくため除去されることが好ましい。クロマトグラフィー操作が、N-及びO-グリカンから複合体又は複合体由来物質を実質的に除去し、かかる物質のない未分別プールとしてN-及びO-グリカンを残しておくために行われることも好ましい。

【0021】あるグリカンの場合には、ヒドラジンとの反応結果として生じるあらゆる遊離アミノ基をN-アセチル化させるN-アセチル化反応を行うことが必要かもしれない。関与するグリカンの全構造の予知識なしでは、このようなN-アセチル化が必要かどうかを事前に予想することは困難である。したがって、すべてのケースにおいてこの反応を予防処置として行うことが好ましい。N-アセチル化された単離N-及びO-グリカンは、反応中に生成するアセトヒドラゾン誘導体を開裂して完全未変換N-及びO-グリカンを再生成させるため、酸性条件下（固定形の酸、鉱酸又はルイス酸の使用による）におかれることも好ましい。

【0022】本発明は、N-及びO-グリカンの単離も含むN-及びO-グリカンの放出方法も提供し、その方法は、糖複合体をヒドラジン試薬の影響下におき（ここで、前記糖複合体は実質上無塩かつ実質上無水であり、上記ヒドラジン試薬は実質上無水である）、実質上非還元かつ完全な形でN-及びO-グリカンを後に回収するような方法で糖複合体からN-及びO-グリカンを放出させるように糖複合体がヒドラジン試薬の影響下におかれている条件をコントロールし、クロマトグラフィー物質にN-及びO-グリカン（及びそのいずれかの誘導体）を吸着させるために糖複合体をヒドラジン試薬の影響下におくことで形成された反応混合物を第一クロマトグラフィー物質と接触させ、クロマトグラフィー物質を溶出に付し（ここで、前記吸着及び溶出は複合体及び／又は複合体由来物質からN-及びO-グリカン（及びそのいずれかの誘導体）を分離させかつヒドラジン試薬を除去させるように行われる）、遊離第一アミノ酸基を有するN-及びO-グリカンの誘導体が存在する場合にはその誘導体から非還元グリカンを得るためN-アセチル化反応を行い、N-アセチル化反応が行われた方法で必要とされる場合にはN-アセチル化反応後に得られた反応混合物から一価及び／又は二価陽イオンを除去し、第二クロマトグラフィー物質への吸着及びそれからの選択

的溶出によりかかる反応混合物からN-及びO-グリカン又はその誘導体を分離し、いずれのN-及びO-グリカン誘導体も非還元形に変換する工程を含んでなるもの、である。

【0023】例えば、N-アセチル化反応は第一クロマトグラフィー物質からの脱着前又は後のいずれで行ってもよい。更に例えば、第二クロマトグラフィー物質から溶出後に得られるN-及びO-グリカンの誘導体がアセトヒドラゾン誘導体である場合には、マイルドな酸性条件が非還元N-及びO-グリカンを生成させるために用いられる。

【0024】発明の具体的な説明

本発明は糖複合体に全般的に適用可能であるが、しかしながら以下の説明では、科学文献で研究用のモデル糖タンパク質として許容されるN-及びO-グリカンを含有した牛フェツインについて特に言及する。

【0025】糖複合体をヒドラジン試薬の影響下におく（即ち、ヒドラジン分解）前に、糖複合体及びヒドラジン試薬は下記のように調製されることが好ましい。糖複合体は例えば適切な系で透析、ゲル濾過又はクロマトグラフィーにより本質的に無塩化される。無塩化されると、糖複合体は例えば凍結乾燥で本質的に無水化されるが、含水率は25℃で25ミリバールの凍結乾燥条件下において少なくとも平衡状態に達するまで減少される。ヒドラジン試薬の含水率も同様に関連し、4容量/容量%を超えるべきではない。このため最も商業的に利用される無水ヒドラジン試薬が適切であるが、但しヒドラジン試薬の乾燥は多数報告されたプロセスのうち1つで行うことができる。次いで適切なヒドラジン試薬は気密容器内で適切に調製されたサンプルに加えられる。糖複合体とヒドラジン試薬の反応は微視的又は巨視的のいずれかでエネルギー入力により、例えば温度を高めることにより開始することができる。いかなるエネルギー入力方法の場合でも、反応に関する最適条件は様々な実験的アプローチから求めることができる。本開示にける反応を開始させる好ましい方法では温度を定常状態まで上昇させる。

【0026】経時的に様々な温度下における収率の実験測定によれば、N-及びO-グリカンを放出させる糖複合体とヒドラジン試薬の反応は一次反応速度論に従うことが本発明により示された。

【0027】したがって、実験結果の分析に関する好ましい理論的骨格はアレニウス式であるが、これは反応速度の温度依存性を一次近似に規定するために普通用いられる。この式は下記のとおりである：

$$k = A e^{-E_{act}/RT}$$

上記式中 k = 反応速度

A = アレニウス定数

R = 気体定数

E_{act} = 活性化エネルギー

9

10

T=温度

【0028】N-及びO-グリカンが放出され、しかる後放出されたN-及びO-グリカンが追加分解反応に付されるようないかなる化学反応においても、それは下記*

$$m_O = \left[e^{-(A_{do} e^{-E_O^D/RT}) \cdot t} \right] - \left[e^{-(A_{ro} e^{-E_O^R/RT}) \cdot t} \right]$$

完全形で放出されるN-グリカンのモル分率=

【0030】

※【数4】

※

$$m_N = - \left[e^{-(A_{rn} e^{-E_N^A/RT}) \cdot t} \right] + \left[e^{-(A_{dn} e^{-E_N^D/RT}) \cdot t} \right]$$

【0031】上記式中e=自然対数

A_{ro}=O-グリカンの放出に関するアレニウス定数A_{do}=O-グリカンの分解に関するアレニウス定数E_o^A=O-グリカンの放出に関する活性化エネルギーE_o^D=O-グリカンの分解に関する活性化エネルギーA_{rn}=N-グリカンの放出に関するアレニウス定数A_{dn}=N-グリカンの分解に関するアレニウス定数E_n^A=N-グリカンの放出に関する活性化エネルギーE_n^D=N-グリカンの分解に関する活性化エネルギー

R=気体定数

T=温度

t=時間

【0032】条件は完全N-及びO-グリカンの前選択収率（例えば、85%以上のような収率）を達成しうるように上記式に従い選択される。好ましい収率は85%以上のような高収率であるが、更に低い収率が許容されてもよく、このように低い収率を導く条件も前記式に従い選択してよい。

【0033】完全N-及びO-グリカンの放出に関して適した温度及び時間の条件は、完全N-及びO-グリカンの放出が温度のみの関数として測定される実験から求めることができるが、このような実験ではA_{ro}、A_{do}、E_o^A、E_o^D、A_{rn}、A_{dn}、E_n^A及びE_n^Dの決定が可能である。かかる実験の結果は添付図面の図3で示されるが、その場合に完全N-及びO-グリカンの相対的放出率は様々な温度で8時間適切なヒドラジンと共に糖タンパク質牛フェツインのインキュベート後で測定される。

【0034】図3で示されたデータから、完全N-及びO-グリカンの所定回収率に関して必要な温度及び時間の大体の条件は計算できる。O-グリカンに関するかかる計算例は添付図面の図4で総括され、N-グリカンの場合は添付図面の図5で総括されている。O-グリカンの場合における放出及び分解の相対的速度は、O-グリカンの所定回収率に関する条件が図4の温度/時間グラフ上の領域で規定されているとおりである。例えば、ラインL-1及びL-4間にある点で規定される温度及び時間の条件のみが完全O-グリカン回収率94%以上を

*アレニウス式から求められる:

完全形で放出されるO-グリカンのモル分率=

【0029】

【数3】

$$m_O = \left[e^{-(A_{do} e^{-E_O^D/RT}) \cdot t} \right] - \left[e^{-(A_{ro} e^{-E_O^R/RT}) \cdot t} \right]$$

※【数4】

許容し、同様にラインL-3及びL-2間にある点で規定される条件のみが完全O-グリカン回収率90%以上を許容する。N-グリカンの場合において、分解は図5の曲線で規定された条件で、但し温度条件105℃以上かつ4時間以上でのみおきない。図4及び5のデータを比較すると、これらの実験条件下でN-及びO-グリカン双方の高回収率（例えば85%以上）が得られる条件範囲は添付図面の図6における斜線領域に制限されることがわかる。この領域内に含まれるこの開示で用いられた条件は95℃で3.75時間である。同様の分析が他の形の反応開始に関する反応条件を規定するために用いることができる。

【0035】以上で、糖複合体からN-及びO-グリカンをうまく放出させる反応は完成である。更に未放出グリカンの研究及び分析のために、グリカンは未反応ヒドラジン試薬及び複合体又は複合体由来物質から最初に分離されることが好ましい。インキュベート後、未反応ヒドラジン試薬は2通りのうち1つで除去できる。第一は減圧蒸発しかる後混和性物質（例えば無水トルエン）との反復共蒸発による。第二の及び本明細書で記載される好ましい方法は、クロマトグラフィー媒体への反応混合物中グリカンの吸着によるが、そのうち本明細書で好ましい媒体はセルロースベース物質であり、それによってグリカンの反復操作がなく、放出グリカン収率の選択的低下及び汚染物質の導入なしに、未反応ヒドラジン試薬を除去しかつ放出グリカンから複合体又は複合体由来物質も実質上除去しうる。これは下記のように行われる:

40 【0036】適切な抽出溶媒（その例はブタノール、エタノール及び酢酸（4:1:0.01~0.6(v/v/v)間に変化）である）中で平衡化された微結晶セルロース（その市販例はアビセル(Avicel)である）のカラムにく反応混合物が適用される。N-及びO-グリカン並びに一部の汚染物はセルロース粒子に吸着され、ヒドラジン試薬は抽出溶媒を用いて溶出され（典型的には溶媒の3回カラム洗浄が必要である）、N-及びO-グリカンはメタノール及び水又は望ましい水性緩衝液（典型的には2~3倍カラム容量）を用いて脱着（及びこうして溶出）される。

【0037】こうして得られたN-及びO-グリカンは遊離第一アミノ基部分を有しているかもしれない。したがって、これらの基は真に非還元性のN-及びO-グリカンを生成するため所望であればN-アセチル化できる。様々な方法がこのようなN-アセチル化を行うために報告されている。好ましい態様において、N-及びO-グリカンは、メタノール/水混合液又はpH5.0の水性酢酸ナトリウム緩衝液のいずれかの中における、過剰無水酢酸との反応でN-アセチル化される。このようなN-アセチル化は効率低下なしに0~37℃の温度で行えるが、定量的N-アセチル化は30分間以内でおきる。メタノール/水又は酢酸ナトリウム溶液の使用は、ヒドラジン試薬除去用セルロースカラムからN-及びO-グリカンを溶出させることができ、その結果N-アセチル化前にあらゆるサンプル操作を回避できるので好ましい。一価陽イオン含有水性緩衝液が用いられる場合には、このような陽イオンはプロトン形の強陽イオン交換樹脂にN-アセチル化混合物を通して除去される。様々なこのような樹脂が利用可能かつ適切であるが、好ましい樹脂はスルホン酸官能基を有するスチレン/ジビニルベンゼンポリマー格子、ダウエックス(Dowex) AG 50 X 12 (H⁺) である。一価及び/又は二価陽イオン含有水性緩衝液が用いられる場合には、かかる双方のイオンを除去するために十分な樹脂を含有した混合層カラムが用いられる。これは典型的には二価陽イオンを除去するためキレックス(Chelex) 100 (Na⁺) 及び一価陽イオンを除去するためダウエックスAG 50 X 12 (H⁺) の使用を要する。N-アセチル化が陽イオンの非存在下で行われる場合には、かかる陽イオン交換クロマトグラフィーは不要である。

【0038】本方法のこの段階において、いかなる残留する微量の複合体又は複合体由来物質もクロマトグラフィープロセスによりグリカン含有N-アセチル化混合物から除去される。予め水及びメタノールで連続洗浄される後ブタノール、エタノール、水溶媒(組成4:1 ≤ 0.5)で十分平衡化された微結晶セルロースのカラムに無陽イオンサンプルが4:1 ≤ 0.5 (v/v/v) ブタノール、エタノール、水組成溶媒で適用される。すべてのサンプルを充填した後、いかなる複合体又は複合体由来物質もブタノール、エタノール、水溶媒(典型的組成4:1:0.5 v/v/v)又はトルエン、メタノール、酢酸溶媒(典型的組成3:1:1 v/v/v)の使用により吸着されたグリカンから溶出される。典型的には、3~5倍カラム容量の洗浄液がこのような物質をうまく除去する上で必要である。次いでグリカンはメタノール、水又は望ましい水性緩衝液での溶出により脱着され、こうして溶出されたグリカンが集められる。

【0039】本方法のこの段階において、セルロースカラムからN-及びO-グリカンを溶出させるために用いられた前記場合と関連した組成の溶媒中に(元来糖複合

体に結合していた)完全N-及びO-グリカンを含有した溶液が存在する。この段階におけるN-及びO-グリカンは、かかるN-及びO-グリカンの真に非還元性のオリゴ糖及びアセトヒドラゾン誘導体の混合物からなる。アセトヒドラゾンの開裂によるアセトヒドラゾン誘導体からの真に非還元性のN-及びO-グリカンへの変換は、固定されているか否かにかかわらずマイルドな酸、鉱酸又はルイス酸に、N-及びO-グリカン混合物を接触させることで行われる。様々なこのような方法が以前報告されており、通常それらは満足できる。N-及びO-グリカンは通常蒸発により溶媒から除去され、水に再懸濁され、更に調べられる前に凍結乾燥される。

【0040】上記方法により、複合体又は複合体由来物質に汚染されていない完全非還元N-及びO-グリカンは、N-及びO-グリコシド結合で複合体に結合されたN-及びO-グリカンを含有した糖複合体から高収率で得られる。最終プール中における複合体又は複合体由来物質の存在は様々な技術で評価できるが、その中の1つは酸性加水分解(6N HCl、104℃、60分間)しかる後ペプチド物質のニンヒドリンに基づく定量である;これは当業者に利用可能な標準的操作である。

【0041】N-及びO-グリカンの完全性及び定量は様々な技術で評価できる。本発明に関して用いられる2つの例は以下である:

(1) N-及びO-グリカンから得られる単糖類の組成分析

(2) N-及びO-グリカンの還元放射性同位元素標識(例えば、トリチウム化)アルジトールの高電圧ベーパー電気泳動及び高分解能ゲル透過クロマトグラフィー

【0042】本発明は、単なる例示として添付図面及び以下の例を参照して記載される。

例:牛血清フェツインからのN-及びO-グリカンの放出及び単離

この例において、N-及びO-グリカンを糖タンパク質牛フェツインから放出させ、こうして回収されたN-及びO-グリカンを完全性、収率及び純度に関して調べた。牛胎児血清からのフェツインはシグマ・ケミカル社(Sigma Chemical Company)(Poole, Dorset, 英国)から購入した。糖タンパク質1mgをガラス蒸留水に対する十分なマイクロフロー透析により無塩化した。透析後、溶液はエドワーズ・モジュールヨ(Edwards Modulyo)凍結乾燥機を用い25ミリバール圧で作動させて透明ガラス反応管内で凍結乾燥させた。凍結乾燥された糖タンパク質に無水ヒドラジン(相対含水率2.0%v/v以下)0.5mlを加えた。管を無水かつ無酸素雰囲気下室温で密封し、しかる後95℃で平衡化されたオープンに3.75時間入れた。

【0043】次いで、未反応ヒドラジンを下記のようにカラムクロマトグラフィーにより管内において反応混合物から除去した。微結晶セルロース(アビスル)の前調

製前平衡化（組成4：1：0.15 v/v/v のブタノール、エタノール、酢酸溶媒）カラム（層容量2ml）の頂部にフローなしで平衡化溶媒4mlを加えた。次いで管内から反応混合物（即ち、ヒドラジン分解産物）（0.5 ml）をカラムに加え、しかる後すべてフローなしに十分ミックスして単一相を形成させた。次いで液体フローを始め、すべての液体がカラムを通過したとき、カラムを3倍カラム容量の平衡化溶媒で洗浄した。次いでカラムを1倍カラム容量のメタノールしかる後2倍カラム容量の水性酢酸ナトリウム（200mM、pH5.0）で洗浄した。再N-アセチル化はプールの溶出液への0.5ml無水酢酸添加及び室温で1時間のインキュベートにより行った。

【0044】次いで得られたN-アセチル化混合物を容量2.2mlのダウエックスAG50X12（H⁺）カラムに通し、しかる後カラムを5倍カラム容量の蒸留水で洗浄した。溶出液及び洗液を合わせ、しかる後ロータリーに蒸発乾固させた。次いで全サンプルをガラス蒸留水0.3mlにいれ、セルロース層上にブタノール、メタノール（4：1 v/v）2.0mlを含有した前調製前平衡化微結晶セルロースのカラム（0.8×5cm）の頂部にフローなしに適用した。水層及びブタノール/エタノール相を単一な均一相になるまで十分にミックスし、しかる後フローを始めた。すべての液体が通過した後、カラ*

*ムを5倍カラム容量のブタノール、エタノール、水溶媒（組成4：1：0.5 v/v/v）で洗浄した。次いでカラムを1倍カラム容量のメタノール及び2倍カラム容量の蒸留水で洗浄した。メタノール及び水分画を同時プールし、ロータリー蒸発させ、1mM酢酸銅(II)水溶液0.2mlにいれ、室温で30分間インキュベートし、キレックス100（Na⁺）及びダウエックスAG50X12（H⁺）の各樹脂300μL含有タンデムカラムに通した。カラムを5倍カラム容量の水で洗浄し、溶出液及び洗液を同時プールし、（0.2μM テフロン膜フィルター）濾過し、ロータリーに蒸発乾固し、ガラス蒸留水1mlにいれた。一部の非還元オリゴ糖分画をニンヒドリン法により単糖組成及びアミノ酸含有率に関して分析した（結果は下記表1で示されている）。一部の非還元オリゴ糖をアルカリ性NaB₃H₄還元で放射性同位元素標識し、こうして得られた放射性同位元素標識オリゴ糖アルジトールを（脱酸性化後）荷電及びサイズに関して分析した。結果は添付図面の図7及び図8に示されている。これら分析の全体的結論は、ペプチド物質以外の汚染物質が検出できず、ペプチドのレベルが10%（重量）以下であり、グリカンが完全であって高収率（例えば85%以上）で回収されることである。

【0045】

表1

	N-アセチル ガラクトサミンの 全含有量* (nmol)	N-アセチル グルコサミンの 全含有量* (nmol)	アミノ酸の 全含有量* (nmol)
出発糖タンパク質	52.5	252.5	6918
最終グリカンプール	45.1	217.2	332

【0046】*糖タンパク質フェツインにおいて、N-及びO-グリカンの含有量はN-アセチルグルコサミン及びN-アセチルガラクトサミンの含有量に各々直接関連していることが通常認められる。したがって、N-アセチルグルコサミン及びN-アセチルガラクトサミンの含有量は、本発明で記載された方法を行った後に得られたグリカンプール及びフェツイン糖タンパク質双方におけるN-及びO-グリカンの好ましい測定値として用いられる。

【0047】本発明に従い糖タンパク質牛フェツインを処理することにより、あるプロセス順序で汚染物質のない完全N-及びO-グリカンを高収率（例えば85%以上）で回収しうることが確立された。完全N-及びO-グリカンが回収されるプロセス順序が規定されたが、この順序は容易に自動化しうようなものである。これがそうであることは、糖複合体の凍結乾燥サンプルを回収して、かつ、その糖複合体と前に連結していた完全N-及びO-グリカンを首尾よく運搬しうる機械を構築し、作動させることによって立証される。

【0048】自動化プロセスの説明

N-及びO-結合グリカンは図9で示された自動化プロセスで本開示の方法を用いて糖複合体から放出させることができる。

【0049】水、メタノール、ブタノール/エタノール4：1（v/v）、ブタノール/エタノール/酢酸4：1：0.15（v/v/v）、0.2M酢酸ナトリウム溶液、0.1M酢酸銅/酢酸pH4.0溶液、無水酢酸（17.4M）及びヒドラジンを各々含有した上の列のすべての容器は、市販グレードの無水アルゴンの供給機に連結されていることに留意せよ。各容器の内容物のうち望ましい量が加圧アルゴン導入ラインを用いて関連容器をアルゴンで加圧することによって、L1路に沿って供給でき、このような運搬はシステムソフトウェアのコントロール下にある。本明細書に記載された全プロセスにおいて、すべての溶媒及び試薬は上記容器の1つに貯蔵されかつそこから運搬される。

【0050】被験糖複合体は例えば適切な系で透析、ゲル濾過又はクロマトグラフィーにより実質的に無塩化される。無塩化させると、糖複合体は例えば凍結乾燥で本

質的に無水化され、サンプルの含水率は25℃で25ミリバールの凍結乾燥条件下において少なくとも平衡状態に達するまで減少される。実質上無水のサンプルはリアクターR1に導入されるが、これは図9で示されるような自動化システムに連結されている。サンプルのヒドラジン分解前に、リアクターR1内の空気をアルゴンで実質上置き換えるために無水アルゴンが最初L1、L3路に沿ってサンプル上に通される。次いで相対含水率2.0% (v/v) 以下のヒドラジンが図9の上の部分に示されるようなポイントC1の前でL1路に連結して示されるヒドラジン含有容器からL1、L3路に沿ってリアクターR1に運搬される。

N-及びO-グリカンの放出

【0051】R1への一部ヒドラジンの運搬後に、N-及びO-結合グリカンを放出させるヒドラジン分解反応が本発明に従って選択される時間にわたりリアクターR1内の温度を(周辺に置かれた加熱装置の使用で)上昇させることで、典型的には95℃で3.75時間行われ、しかる後反応混合物は環境温度まで冷却される。

【0052】N-及びO-グリカンの単離

放出されたグリカンからのヒドラジン除去

クロマトグラフィープロセスで未反応ヒドラジンを除去するため、リアクターR1の内容物を一部分づつL3、L5、L2路に沿ってアルゴン圧下でクロマトグラフィーカラムA(微結晶セルロースのようなセルロースベース媒体含有)に移し、この後者の通過時にバルブV1及びV2を用いてブタノール、エタノール及び酢酸4:1:0.15 (v/v/v)の溶媒(L1路に沿って運搬される)とR1内容物5%対溶媒95% (v/v)の適切な比率で混ぜ、混合物をカラムAからウェイス(W2)に通す。次いで更に組成ブタノール、エタノール及び酢酸4:1:0.15 (v/v/v)の溶媒3mlをL1、L3路に沿ってリアクターR1に及びそこからL3、L5、L2路に沿ってカラムAに運搬するが、カラムAの出口は再びウェイス(W2)に向けられる。これはすべての微量ヒドラジンがリアクターR1から除去されることを保証するため同溶媒6mlで繰り返しされる。組成ブタノール、エタノール4:1 (v/v)の溶媒6ml容量を、カラムAに存在するいかなる酢酸も除去するため、L1、L3路に沿ってリアクターR1に及びそこからL3、L5、L2路に沿ってカラムAに運搬するが、カラムAの出口はなおウェイス(W2)に連結される。

【0053】脱N-アセチル化グリカンのN-アセチル化

脱N-アセチル化を行うため、無水酢酸0.2mlをL1、L3路に沿ってリアクターR1にしかる後L3、L5、L2路に沿ってカラムAに運搬するが、この後者の通過時にそれをバルブV1及びV2を用いて溶媒ブタノール、エタノール4:1 (v/v) (L1路に沿って運搬される)と無水酢酸5%対溶媒95% (v/v)の適切な比率で

混ぜ、混合物をカラムAからウェイス(W2)に通す。この運搬及びN-アセチル化反応は30分間続ける。次いで過剰無水酢酸を除去するため、ブタノール、エタノール4:1 (v/v) 溶媒3mlをL1、L2路に沿ってカラムAに運搬する。すべての操作において、カラムAからの出口はウェイス(W2)に向けられる。このステップの最後に、N-及びO-グリカン並びに複合体又は複合体由来物質をカラムAのセルロースに吸着させる。

【0054】複合体物質からのグリカンの分離

10 複合体又は複合体由来物質を除去するため、水0.5ml容量をL1、L3路に沿ってリアクターR1に運搬する。次いで組成ブタノール、エタノール及び水4:1:0.25 (v/v/v)の溶媒混合液を形成するためR1の内容物をバルブV1及びV2を用いてブタノール、エタノール4:1 (v/v) 溶媒(L1路に沿って運搬される)と水5%対溶媒95% (v/v)の適切な比率で混ぜ、この溶媒をカラムAに通すが、カラムAの出口はウェイス(W2)に連結されている。

20 【0055】次いでカラムAのセルロースからN-及びO-グリカンの脱着が下記のように生じる。メタノール(0.2ml)をL1、L2路に沿ってカラムAに4パルス(各50μL)で通すが、各パルスは直ちにアルゴンパルスで追跡され、カラムAの出口はL4路で保持容器(H1)に連結されている。次いで酢酸ナトリウム溶液(3.0ml)をL1、L2路に沿ってアルゴンの同パルスでカラムAに通すが、カラムAの出口はなお保持容器(H1)に連結されている。

30 【0056】次いでN-及びO-グリカンの完全な再N-アセチル化を保証するため、無水酢酸0.1ml容量をL1、L3、L4路に沿って保持容器H1に通し、反応混合物を環境温度で30分間おく。

【0057】完全未変換グリカンの再生

次いでNa⁺イオンをH⁺イオンで置き換えるため、保持容器(H1)の内容物をL4路に沿って1.0mlダウエックスAG50X12(H⁺)層含有クロマトグラフィーカラムBに及びカラムBから直接リアクターR1にL2、L5、L3路経由で通す。次いでグリカン-アセトヒドラゾン開裂を行い完全未変換グリカンを再生するため、酢酸銅0.2mlの溶液をリアクターR1にL1、L3路経由で運搬し、反応混合物を環境温度で60分間おく。次いでCu²⁺イオンをH⁺イオンで置き換えるため、混合物をR1からL3、L5、L2路に沿ってキレックス100(Na⁺)及びダウエックスAG50X12(H⁺)の各0.5ml混合物含有クロマトグラフィーカラムC経由でL4、L9路に沿って遠隔回収部に通す。次いで水1ml容量を洗浄目的でL1、L3路に沿ってリアクターR1にしかる後カラムC経由でL3、L5、L2、L4、L9路に沿って遠隔回収部に運搬する。遠隔回収部で回収された溶液は希酢酸溶液中に放出された完全なN-及びO-グリカンを含含有しており、次の分析のために

装置から除去してもよい。

【図面の簡単な説明】

【図1】 N - 及び O - グリカンにペプチドに結合する N - 及び O - グリコシド結合の図

【図2】 アルカリ条件による N - 及び O - グリコシド結合の開裂に関して現在実施される方法において重要な化学反応を要約した図

【図3】 ヒドラジン分解反応を用いた糖タンパク質牛フェツインからの N - 及び O - グリカン放出に関してインキュベートの定常状態温度の効果を測定するために行われた研究の結果を要約したグラフ

【図4】 本明細書で記載された実験条件下において具体的グリカンの規定回収率に関する温度及び時間の条件の大体の範囲を示したグラフ： O - グリカンの回収

【図5】 本明細書で記載された実験条件下において具体的グリカンの規定回収率に関する温度及び時間の条件の

大体の範囲を示したグラフ： N - グリカンの回収

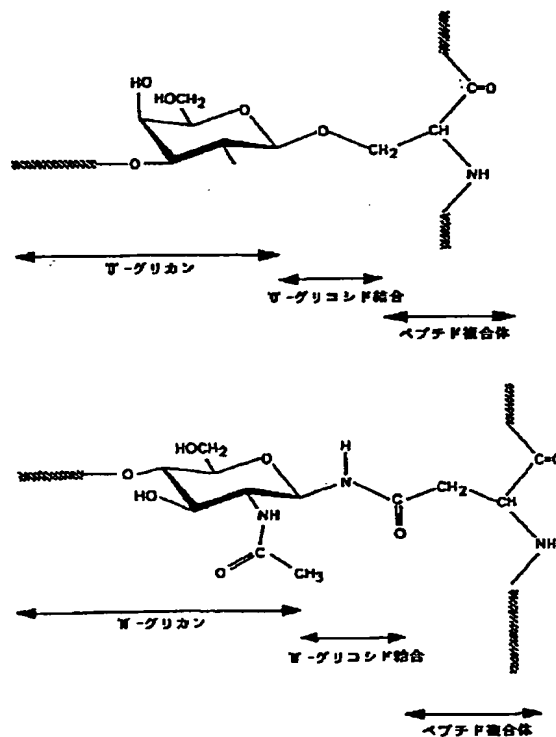
【図6】 本明細書で記載された実験条件下において具体的グリカンの規定回収率に関する温度及び時間の条件の大体の範囲を示したグラフ： N - 及び O - グリカンの同時回収

【図7】 牛フェツインに関する本明細書で記載された好ましい方法の実施により得られた N - 及び O - グリカンの分析の要約： 脱酸性化後における放射性同位元素標識グリカンの高電圧放射線電気泳動グラフ

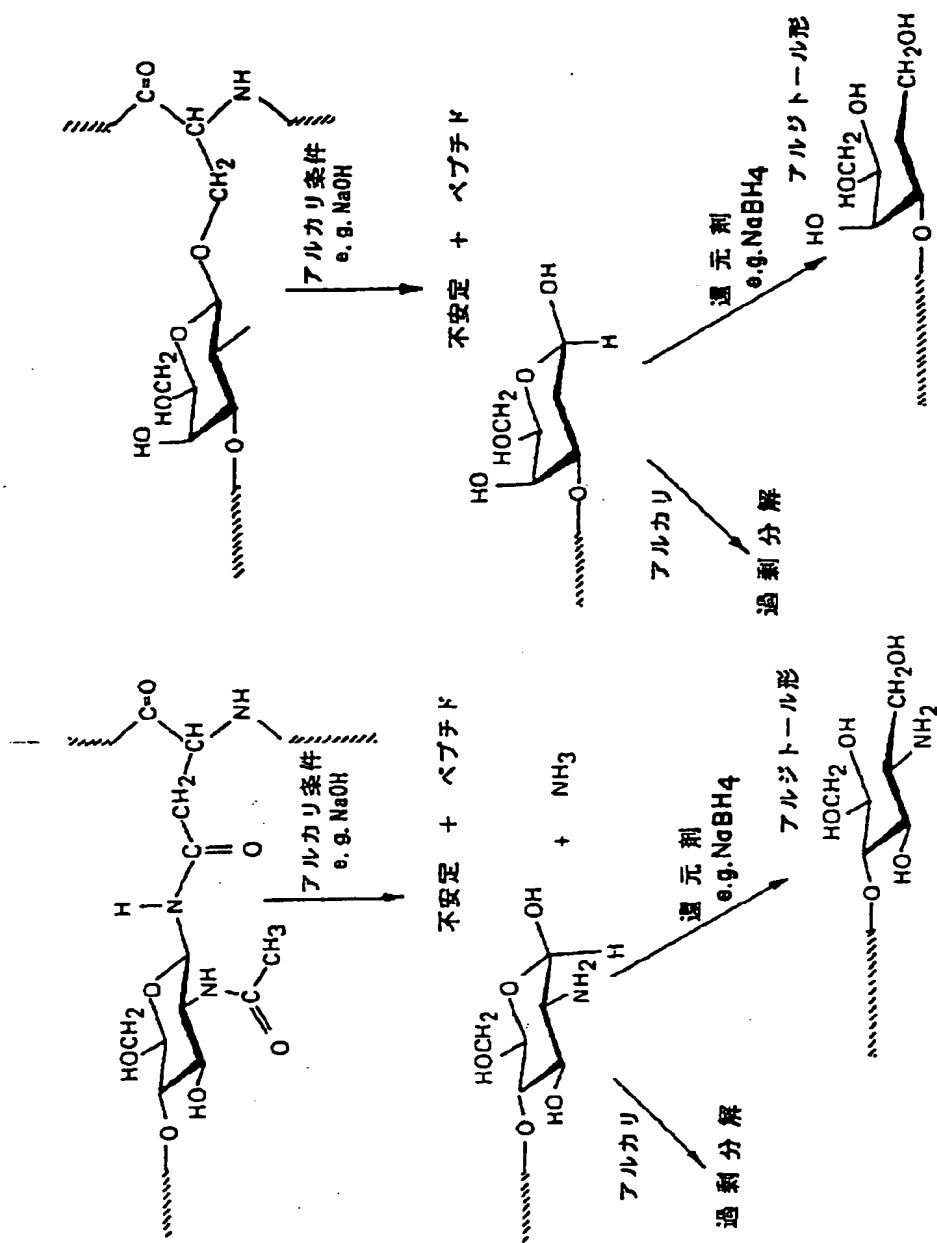
【図8】 牛フェツインに関する本明細書で記載された好ましい方法の実施により得られた N - 及び O - グリカンの分析の要約： 放射性同位元素標識グリカンのゲル濾過クロマトグラム

【図9】 自動化方式で糖複合体から非還元 N - 及び O - グリカンの放出及び／又は単離を行うために示された装置の概略図

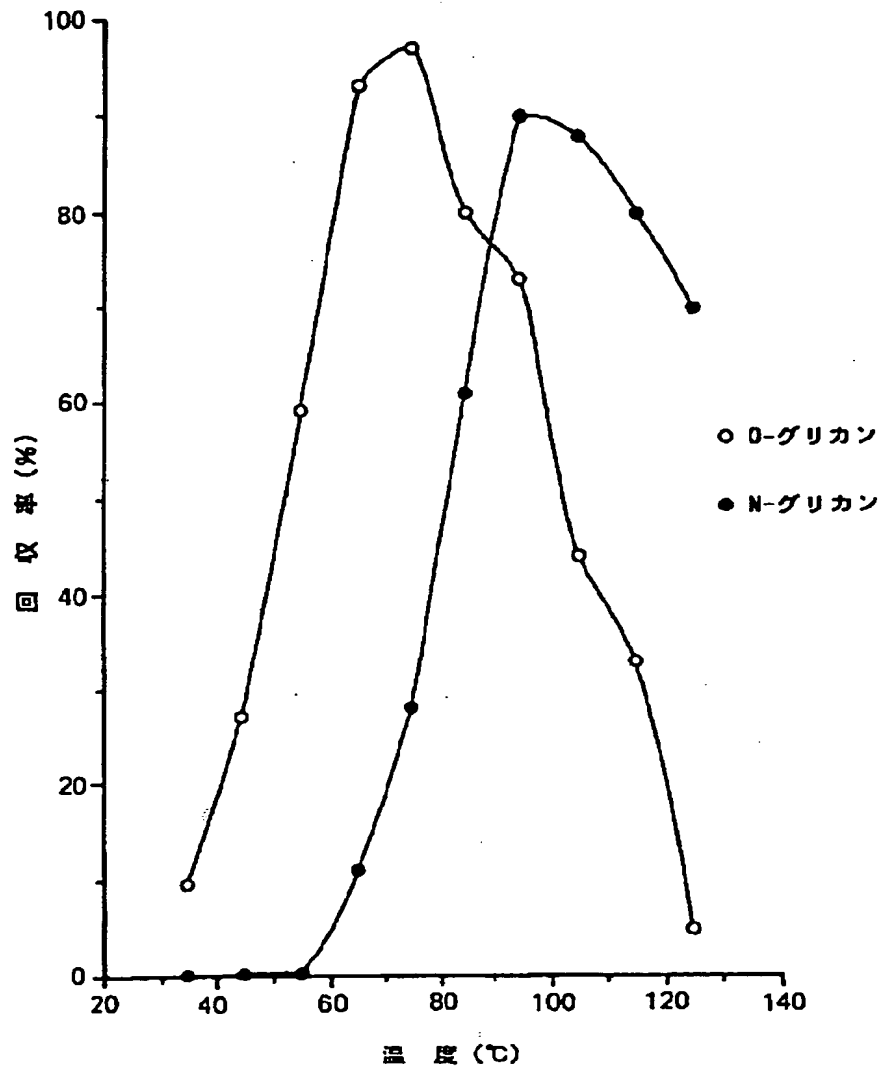
【図1】



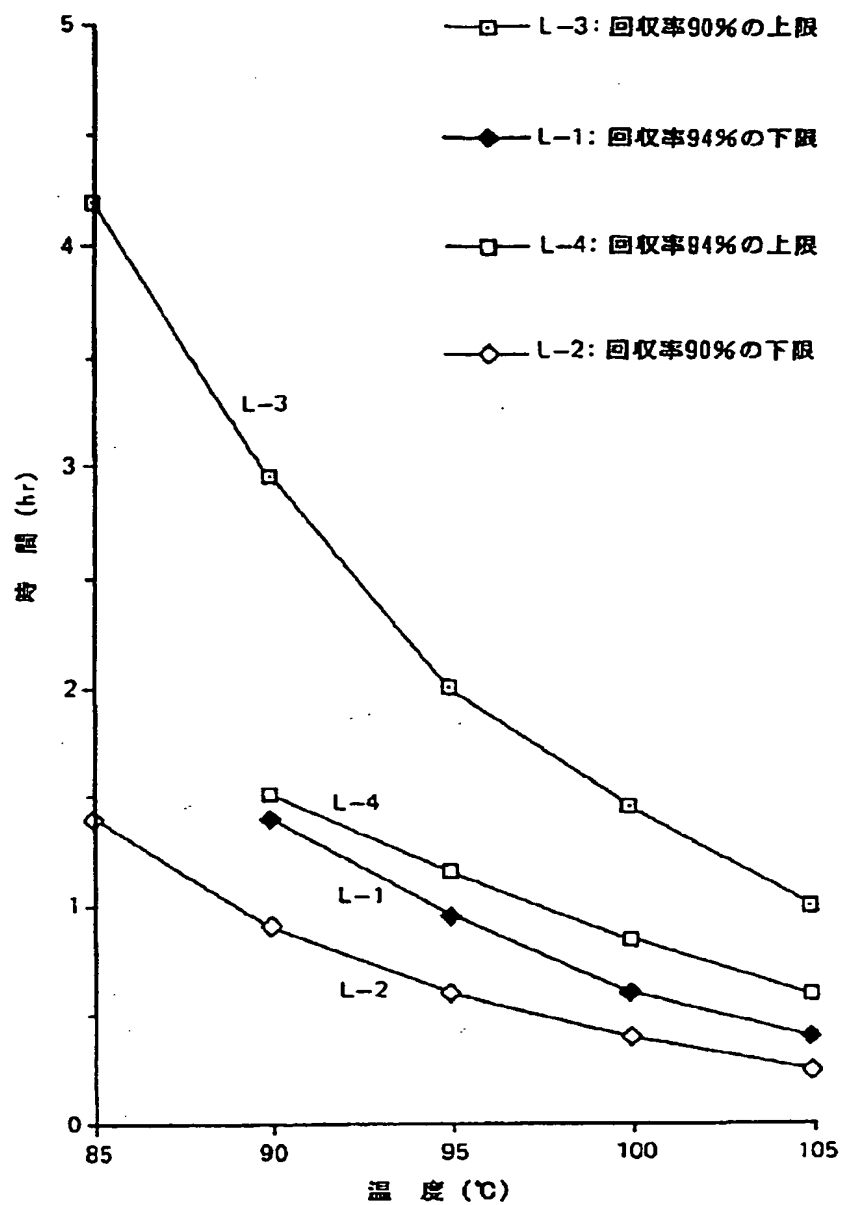
【図2】



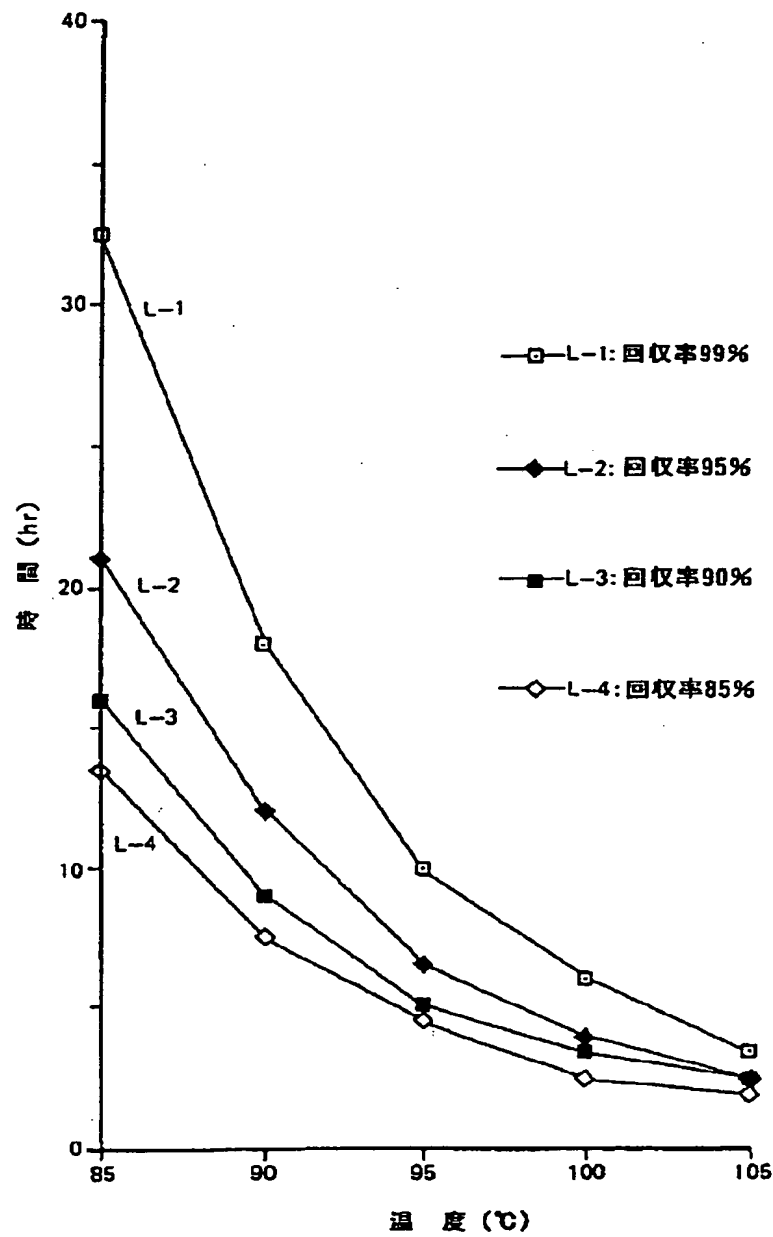
【図3】



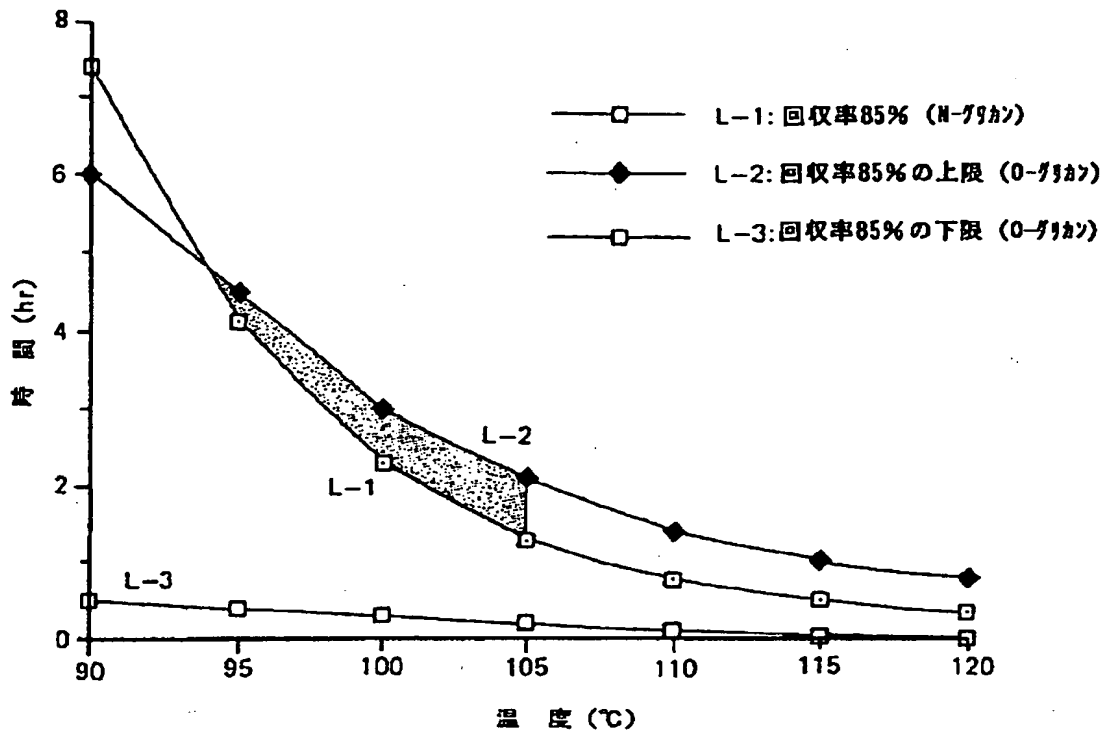
【図4】



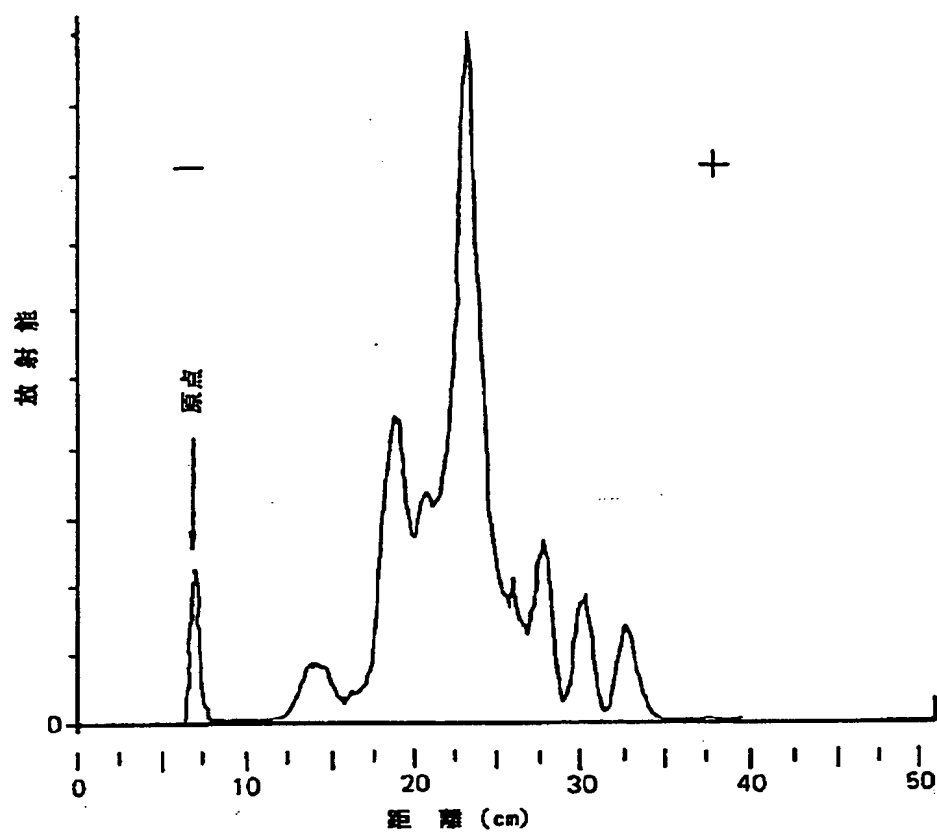
【図5】



【図6】



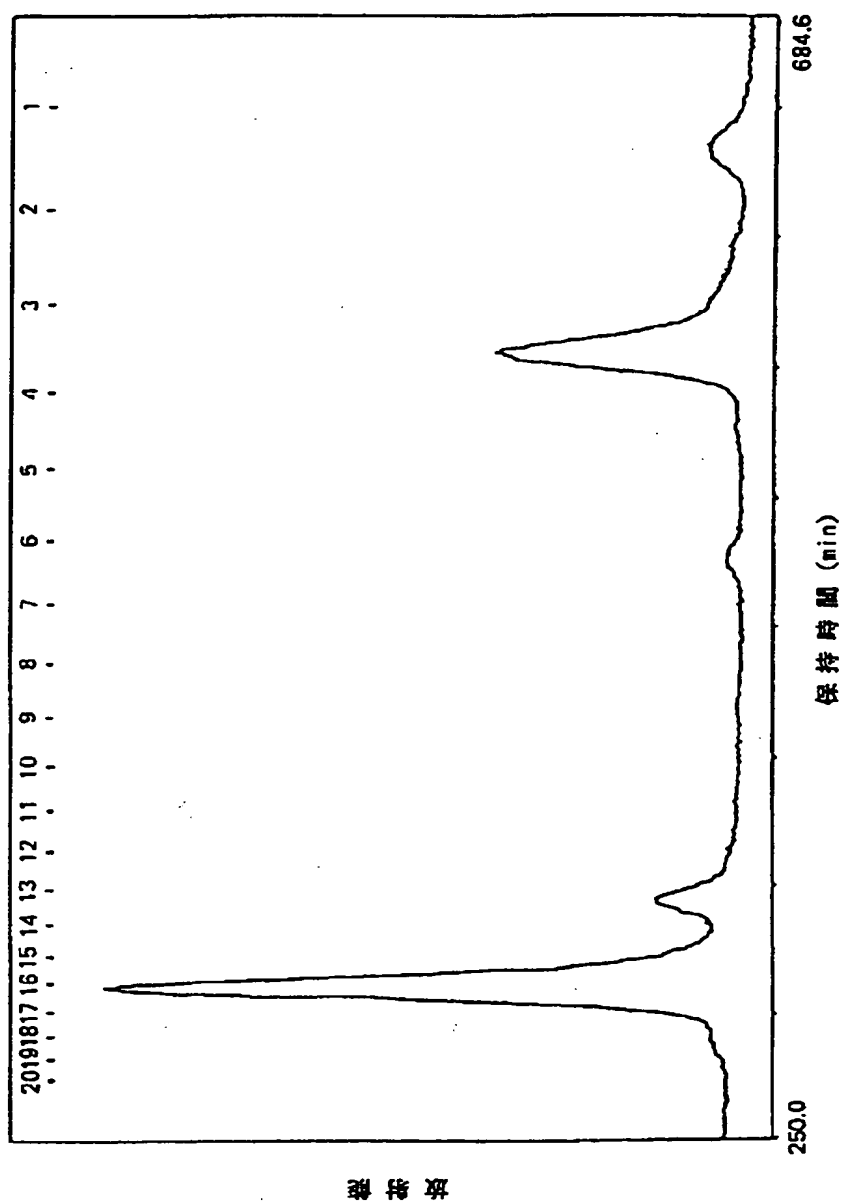
【図7】



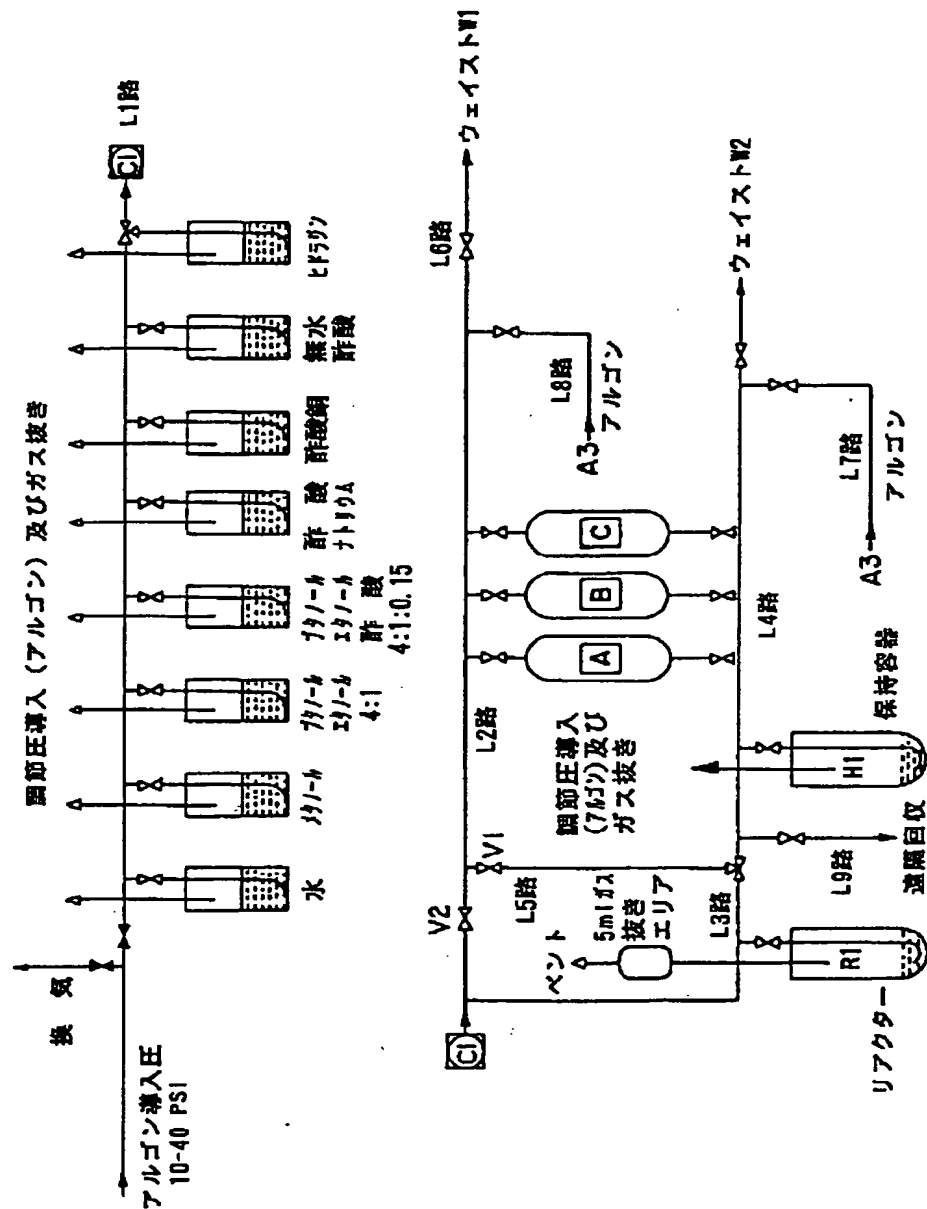
(17)

待開平6-87904

【図8】



【図 9】



フロントページの続き

(72)発明者 アントニー、ヒュー、メリー
イギリス国オクソン、チャールベリ、リト
ル、リーズ、22

(72)発明者 ジェームズ、ブルース
イギリス国オクソン、エンシャム、ウィタム、ビュー、⁵³

This Page is inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ BLACK BORDERS
- ☒ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLORED OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REPERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images
problems checked, please do not report the
problems to the IFW Image Problem Mailbox**